

三代微生物多样性实验流程材料方法

(BMK-20210416 版)

一、提取方法：

使用 TGuide S96 磁珠法土壤/粪便基因组 DNA 提取试剂盒完成核酸的提取。

备注：厂家：天根生化科技（北京）有限公司，型号：DP812

1. 样本处理

1) 土壤样本处理：

在 2 ml 离心管中加入样本 0.25-0.5 g，加入 500 μ l 缓冲液 SA、100 μ l 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠，涡旋振荡 15 min 至样本混匀或使用 TGrinder H24 组织研磨均质仪（OSE-TH-01）混匀（6M/S 的速度振荡 30s，间隔 30s，共 2 个循环）。12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min，转移上清液（约 500 μ l）至新的 2 ml 离心管。

注意：针对一些得率低或需提取真菌基因组的样本，建议涡旋震荡混匀或组织匀质仪震荡混匀后 70°C 加热裂解 15 min 以提高裂解效率。

2) 粪便样本处理：

在 2 ml 离心管中加入样本 0.25-0.5 g，如果是液态样本则转移 200 μ l 至离心管中，加入 500 μ l 缓冲液 SA、100 μ l 缓冲液 SC 和 0.25 g 研磨珠，（粪便样本中可能有 RNA 残留，如果需要去除 RNA，建议再加入 10 μ l RNase A（TIANGEN，RT405-02，自备））涡旋震荡混匀或组织匀质仪震荡混匀后 70°C 加热裂解 15min 提高裂解效率。12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 1 min，转移上清液（约 500 μ l）至新的 2 ml 离心管。

注意：对于较难破壁的革兰氏阳性菌，可将温度提高至 95°C 以促进裂解。

2. 加入 200 μ l 缓冲液 SH 混匀，涡旋 5 sec，4°C 放置 10 min。

3. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 3 min，转移上清液至新的 2 ml 离心管，加入 500 μ l 缓冲液 GFA（使用前请先检查是否已加入异丙醇），颠倒混匀。

注意：转移上清时不要移走沉淀，否则可能降低 DNA 纯度。

4. 加入 10 μ l 磁珠悬浮液 G，振荡混匀 5 min。

注意：为了确保磁珠彻底重悬，请在使用前振荡混匀

5. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。

6. 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ l 去蛋白液 RD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），振荡混匀 5 min。

7. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 700 μ l 漂洗液 PWD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），振荡混匀 3 min。
9. 将离心管放置于磁力架上静置 30 sec，磁珠完全吸附后，小心吸去液体。
10. 重复步骤 8 和 9 一次。
11. 将离心管于磁力架上，室温晾干 5-10 min。

注意：乙醇残留会抑制后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净。但也不要干燥太长时间，以免难以洗脱 DNA。

12. 将离心管从磁力架上取下，加入 50-100 μ l 洗脱缓冲液 TB，振荡混匀，置于 56°C，孵育 5 min，期间震荡混匀 3 回，每回 3-5 次。
13. 将离心管放置于磁力架上静置 2 min，磁珠完全吸附后，小心将 DNA 溶液转移至一个新离心管中，并于适当条件保存。

二、检测方法:

检测方法：使用酶标仪（厂家：基因有限公司 GeneCompang Limited,型号 synergy HTX）对核酸进行浓度检测，根据进行检测扩增，扩增后 PCR 产物使用浓度 1.8%的琼脂糖进行电泳检测（厂家：北京博美富鑫科技有限公司）对完整性进行检测。

合格指标:

目的带大小	目的带检测亮度	说明 1	说明 2	核酸总量	结果判断
目的带大小位置正确，若有杂带，但可通过切胶纯化处理。	目的带亮于 1500bp marker	预估可以一次建库成功	总量满足 2 次及以上建库	≥ 0.3	A
目的带大小位置正确，若有杂带，但可通过切胶纯化处理。	目的带亮于 1500bp marker 或目的带亮度在 1500bp marker 左右	预估建库需要扩 1-2 管；	总量满足 1 次建库	< 0.3	B

三、建库方法:

扩增引物

扩增区域	引物名称	引物序列
16S 全长	27F_(16S-F)	5'- AGRGTTTGATYNTGGCTCAG-3'
	1492R_(16S-R)	5'-TASGGHTACCTTGTTASGACTT-3'

ITS 全长	ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
18S 全长	Euk-A_(18S-F)	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT -3'
	Euk-B_(18S-R)	5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'

检测建库实验所需试剂

物料名称	厂家	存货代码	规格
KOD One™ PCR Master Mix	北京百灵克生物科技有限责任公司	KMM-101	5ml/包
KOD FX Neo(TOYOBO)	北京百灵克生物科技有限责任公司	KFX-201S	20μL/支
VnF (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
VnR (10uM)	苏州泓迅生物科技股份有限公司	-	-
低分子量范围琼脂糖	北京诺驰源生物科技有限公司	-	125g/瓶
Monarch DNA Gel Extraction	北京鸿跃创新科技有限公司	T1020L	250 次/盒
TE 缓冲液 (PH8.0)	北京博美富鑫科技有限公司	T1120	500ml/瓶
琼脂糖 (西班牙)	北京博美富鑫科技有限公司	-	100g/瓶
EB(红色荧光核酸染料)	青岛拓邦生物科技有限公司	E1020-100ml	100ml/瓶
Tris base	北京博美富鑫科技有限公司	-	500g/瓶
EDTA 二钠	北京博美富鑫科技有限公司	-	250g/瓶
乙酸 (冰醋酸)	北京博美富鑫科技有限公司	-	500mL/瓶
250 bp DNA Ladder Marker	北京六合通经贸有限公司	3424A	500μL/支
无水乙醇	青岛拓邦生物科技有限公司		500mL/瓶
去离子水	天根生化科技 (北京) 有限公司	RT120-02(天根)	500ml/瓶
VAHTSTM DNA Clean Beads	南京诺唯赞生物科技有限公司	N411-03	450000μL/瓶
ExKubit dsDNA HS Assay Kit	上海吉泰依科赛生物科技有限公司	NGS00-3012	500 次/盒

PCR 的酶: KOD One™ PCR Master Mix, KOD FX Neo (TOYOBO)

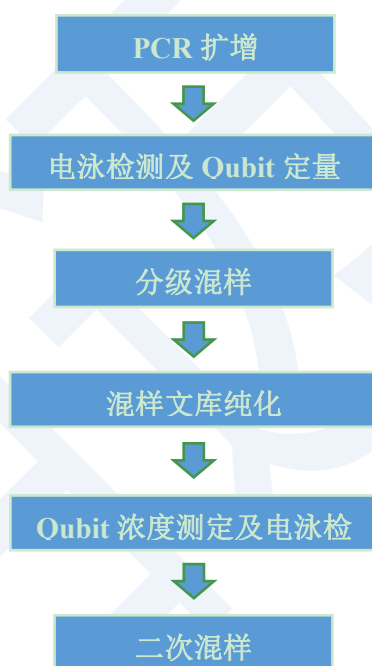
混样后切胶前磁珠纯化: VAHTSTM DNA Clean Beads

切胶后纯化回收: Monarch DNA 胶回收试剂盒

实验所需仪器

仪器名称	生产厂家	型号
瞬时离心机	天根生化科技（北京）有限公司	OSE-MC8
- 20℃度冰箱	青岛海尔特种电冰柜有限公司	BC/BD-629HK
4℃ 冰箱	海尔	HYC-360
涡旋振荡器	SCIENTIFICINDUSTRIES.INC	vortex-2G560E
梯度基因扩增仪	Appliedbiosystems	veriti96well9902
24 孔离心机	Sartorius	3-16P
四维旋转混匀仪	海门市其林贝尔仪器制造有限公司	BE-1100
磁力架	赛默飞世尔	DynaMag96Side skirted

操作流程



(1) 目标区域 PCR (30ul 体系)

1. 反应条件及程序

16S 全长反应体系 (30μl 体系)

试剂	用量 (μl)
基因组 DNA	1.5
NFW	10.5
KOD ONE MM	15
barcode 引物对	3
总体系	30

ITS 全长反应体系 (30μl 体系)

试剂	用量 (μl)
基因组 DNA	1.5
NFW	11.7
KOD ONE MM	15
barcode 引物对	1.8
总体系	30

18S 全长反应体系 (30μl 体系)

试剂	用量 (μl)
基因组 DNA	1.5
NFW	11.7
KOD ONE MM	15
barcode 引物对	1.8
总体系	30

注：barcode 引物对，分别为扩增引物的正向引物和反向引物。

16S 全长反应程序

95°C	2min	25cycles
98°C	10sec	
55°C	30sec	
72°C	1min30sec	
72°C	2min	
4°C	∞	

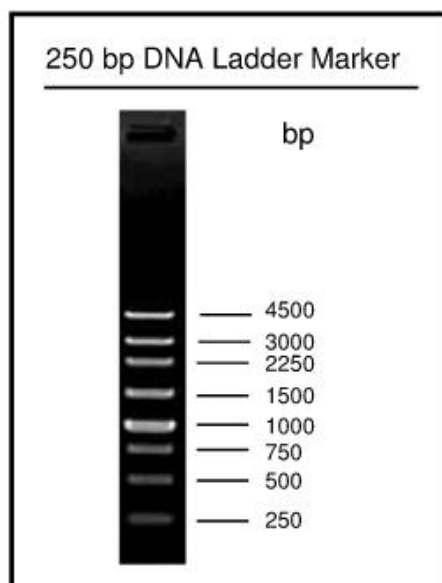
ITS 全长反应程序

95°C	5min	8cycles
95°C	30sec	
55°C	30sec	
72°C	45sec	
95°C	30sec	24cycles
60°C	30sec	
72°C	45sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

18S 全长反应程序

95°C	4min	35cycles
98°C	15sec	
55°C	30sec	
72°C	2min	
72°C	7min	
4°C	∞	

扩增产物进行浓度（Qubit）和条带（琼脂糖凝胶电泳）的检测，符合条件的样品进行混样。注：电泳检测条件 1.8%的检测胶，电压 120V，40 -45min，250 bp Marker。



1、Qubit 定量及混样（PCR 产物）

- 1、16S 全长按照 Qubit 值进行定量操作；
- 2、18S 和 ITS 建议，结合部分产物 Qubit 值，并结合电泳胶图进行手动调节。
- 2、PCR 产物浓度调整：样品扩增产物 Qubit 测定值与其电泳胶图两者结合，对 PCR 产物浓度进行调整，举例说明，如下图，16S 全长以 1500bp 亮度为主，16S 产物亮度高于此带亮度即可满足混样要求。

4、测序方法

对于构建好的文库使用 PacBio 公司提供的建库试剂盒（SMRTbell Template Prep Kit）对混合产物进行损伤修复、末端修复及连接接头，反应过程在 PCR 仪器上进行，最终使用 AMPure PB 磁珠纯化回收从而得到上机文库；

最终文库通过浓度（Qubit）及大小（Agilent 2100）的检测，来判定是否符合上机要求；

使用 PacBio Binding kit 对上机文库进行上机前的结合，使文库结合上 Primer 及 Polymerase；将最终的反应产物进行 AMPure PB Beads 纯化后置于 Sequel II 测序仪上进行上机测序；

保密说明：此文档仅限与 BMK 有项目合作的客户使用，不得随意外传，谢谢！

望您遵守及谅解！